



REPÚBLICA DE CUBA

986 U.S. PTO
09/866232
05/25/01



Lic. América N. Santos Riveras, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número ciento treinta y dos del año dos mil del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI TRANSGLUTAMINASA CON UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA**, con fecha siete de junio de dos mil, a las once horas ante meridiano, por Mariela Vázquez Castillo, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA** cuya invención fue creada por Luis Tomás Sorell Gómez y Boris Ernesto Acevedo Castro.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Mariela Vázquez Castillo, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los veinticuatro días del mes de abril de dos mil uno.

Lic. América N. Santos Riveras
Directora General

MEMORIA DESCRIPTIVA

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI TRANSGLUTAMINASA CON UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología en particular con el diagnóstico biomédico. El objetivo técnico que se persigue es el desarrollo de un método rápido, sencillo y confiable de evaluación visual que permite, en un sólo paso, la detección de anticuerpos anti transglutaminasa tanto de clase IgA como IgG, en muestras de suero, plasma o sangre humana lo que hasta el momento viene haciéndose a través de métodos instrumentales, básicamente los inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) o por marcaje radioisotópico (Radioligando). Estas mediciones resultan de utilidad para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

La enfermedad celíaca (EC) es una enfermedad gastrointestinal severa que se presenta en individuos genéticamente susceptibles y que se caracteriza por una intolerancia permanente (de por vida) a alimentos que contengan proteínas de trigo, cebada, centeno y avena. Aunque se desconoce exactamente los mecanismos fisiopatológicos que provocan la enfermedad se ha demostrado que la presencia de estas proteínas en la dieta de estos pacientes ocasiona en ellos un daño parcial o total de la mucosa intestinal (Brandtzaeg, P. 1997. Mechanisms of gastrointestinal reactions to food. Environmental Toxicology and Pharmacology 4;9-24), que se manifiesta desde el punto de vista clínico con diarreas severas, vómitos, dolor abdominal, anorexia y provoca estados graves de mala absorción con retardo del crecimiento, desnutrición y anemia. Se ha asociado con un riesgo incrementado a padecer cáncer intestinal, sobretodo si no se realiza un diagnóstico temprano y se implanta un adecuado tratamiento (Holmes GKT, 1989. Malignancy in coeliac disease-effect of a gluten-free diet, Gut 30;333-338). El debut de la enfermedad ocurre mayormente antes de los tres años de vida aunque también se presenta y puede ser frecuente en la adultez, a veces de forma atípica o asintomática (Ferguson A, et al. 1992. Definitions and diagnostic criteria of latent and potential coeliac disease. Ed by Auricchio S, Visakorpi JK, in Epidemiology of CD. Dyn Nutr Res, Basel, Karger 2;119-127). Es más frecuente en pacientes con otras enfermedades genéticas y/o autoinmunes como la diabetes mellitus insulino dependiente, el síndrome de Down, el déficit selectivo de IgA o la dermatitis herpetiforme.(Sirgus N et al. 1993. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents in Sweden. Acta Paediatr 66;491-494; Zubillaga P et al. 1993. Down syndrome and coeliac disease. J Pediatr

Gastroenterol Nutr 16:168-171; Boyce N. 1997. Testing for celiac disease may be soon on the rise. LabMedica Internat 14(4):8

Debido a su sintomatología puede confundirse con otros trastornos gastrointestinales por lo que, frecuentemente, no se aplican las medidas correctas de tratamiento, que consisten, de manera exclusiva y de por vida, en la total eliminación de la dieta de estos pacientes de alimentos elaborados con esos cereales (dietas libres de gluten). Un diagnóstico diferencial confiable y certero es de suma importancia pues, si bien es necesario imponer cuanto antes el tratamiento específico a aquellos que lo necesitan, o sea una dieta libre de gluten a los pacientes celíacos, también es sumamente lesivo mantener una persona que no lo necesita sin consumir estos cereales en su dieta de por vida.

En la actualidad el estándar de oro para el diagnóstico de la EC es la biopsia intestinal, realizada en tres momentos diferentes:

- al debut de los síntomas clínicos
- después de varios meses bajo un régimen de dieta libre de gluten
- en un nuevo régimen de dieta con gluten (reto)

Debido a lo invasivo de este diagnóstico y al desarrollo de pruebas serológicas apropiadas y confiables, actualmente se acepta que el diagnóstico de la enfermedad puede efectuarse al debut de los síntomas clínicos mediante pruebas serológicas que sugieran la presencia de la enfermedad y una biopsia intestinal confirmatoria. El desarrollo y evolución posterior de la enfermedad puede seguirse mediante tests serológicos, sin necesidad de nuevos estudios por biopsia a menos que existan discrepancias entre el resultado de las pruebas y los síntomas clínicos (Walker-Smith et al. 1990. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Arch Dis Child 65:909-911). Las pruebas serológicas pueden estar dirigidas a medir los anticuerpos en suero contra antígenos celulares o tisulares o contra antígenos de la dieta, en particular contra gliadinas de trigo. Esto ha dado origen a la aparición de distintos kits diagnósticos para la medida de:

- Anticuerpos anti endomisio
- Anticuerpos anti reticulinas
- Anticuerpos anti gliadinas

Los anticuerpos anti endomisio han resultado los de mayor especificidad para el diagnóstico serológico de la enfermedad (Kapuschinska A et al. 1987. Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomysial antibodies in celiac disease. J Pediatric Gastroenterol

6:529-534; Rossi TM et al. 1988. Relationship of endomysial antibodies to jejunal mucosal pathology: specificity towards both symptomatic and asymptomatic celiacs. J Pediatr Gastroenterol Nutr 7:858-863). Son sin embargo métodos por inmunofluorescencia que utilizan láminas con cortes de tejido de esófago de mono o de cordón umbilical que son incubadas con las muestras de suero y que requieren para su realización de un personal técnico de alta calificación y una gran experiencia para la correcta interpretación de los resultados debido al nivel de subjetividad que los caracteriza. Por su propia complejidad no son métodos apropiados para el análisis de un gran número de muestras cada vez y además son bastante caros por lo que no resulta el método ideal para el screening primario de la enfermedad en grupos de riesgo. Otra desventaja es que por este método sólo se detectan anticuerpos de clase IgA y una de las situaciones clínicas que a veces está presente en los pacientes celíacos es un déficit selectivo de IgA, y que por lo tanto no podrían ser diagnosticados por este método.

Por otro lado la detección de anticuerpos anti gliadinas ha sido utilizada extensivamente para el diagnóstico serológico de la EC (Stern M et al. 1996. Validation and standardization of serological screening tests for coeliac disease in 1996. 3rd EMRC/ESPGAN Workshop, Dec 5 – 8, 1996, Molsheim, France, pp:9-24; Catassi C et al. 1999. Quantitative antigliadin antibody measurement in clinical practice: an Italian multicentre study. Ital J Gastroenterol Hepatol 31; 366-370). Su principal ventaja es que la detección de estos anticuerpos se realiza en la mayoría de los casos por métodos inmunoenzimáticos en fase sólida tipo ELISA que resultan más sencillos de realizar que la inmunofluorescencia y pueden ser automatizados, lo que posibilita el análisis simultáneo de gran número de muestras. Como desventaja se ha reportado que son menos específicos para el diagnóstico de la EC que los anticuerpos anti endomisio y además la detección de anticuerpos de clase IgA o IgG requiere de dos ensayos independientes. Recientemente se ha reportado el desarrollo de un sistema de evaluación visual para la detección de anticuerpos anti gliadinas que supera algunas de estas dificultades (Garrote JA, Sorell L, Alfonso P et al 1999. A simple visual immunoassay for the screening of coeliac disease. Eur. J. Clin Invest 29; 697-699) que ha sido objeto de una solicitud de patente presentada en España (No de solicitud: 9801067).

En 1997, Dietrich y colaboradores, demostraron que la transglutaminasa tisular (TGt), una proteína de 85 kDa, puede representar el autoantígeno principal (sino el único) contra el cual están dirigidos los anticuerpos anti endomisio (Dietrich W et al. 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Med. 3:797-801). Esto ha dado pie a postular que la TGt es el autoantígeno para la EC y a su utilización con fines diagnósticos.

De manera acelerada han aparecido reportes en la literatura de sistemas de diagnóstico tipo ELISA o por Radioligando (RLA) para la detección de anticuerpos anti transglutaminasa, empleando para ello TG extraída de hígado de cobayo o TGt humana recombinante, clonada y expresada a partir de mRNA de distintos tejidos (Sulkanen S et al. 1998. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115:1322-1328; Siessler J et al. 1999. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: Evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease. *Horm Metab Res* 31: 375-379). La sensibilidad y especificidad reportada con estos métodos para el diagnóstico de la EC iguala o supera a la de los anticuerpos anti endomisio (Bazzigaluppi A et al. 1999. Comparison of tissue transglutaminase-specific antibody assays with established antibody measurement for coeliac disease. *Journal of Autoimmunity* 12:51-56; Amin M et al. 1999. Correlation between tissue transglutaminase antibodies and endomysium antibodies as diagnostic markers of coeliac disease. *Clin Chim Acta* 282: 219-225), que como antes se señaló, eran hasta entonces considerados los mejores para el diagnóstico serológico de la EC.

La principal limitante de estos procedimientos es que se trata de técnicas instrumentales que requieren para su realización y evaluación de equipamiento de laboratorio (lectores de placas de microutilación o contadores de radiactividad) y de un personal técnico altamente capacitado. Son además métodos laboriosos que contemplan múltiples operaciones y toman varias horas para su realización. Se requiere además de dos ensayos independientes si se pretende la detección de anticuerpos anti transglutaminasa de clase IgG o IgA.

Actualmente existen inmunoensayo inmunocromatográfico desarrollados para el diagnóstico de embarazo y de enfermedades infecciosas y no infecciosas y cuyos principios generales han sido objeto de distintas patentes, entre las que se pueden destacar, por su relación con la presente invención, las de Shanfun Ching et al. EP 0 299 428 B1 y Rosenstein R. EP 0 284 232 B1)

También se han otorgado patentes que reivindican la utilización de este tipo de ensayos para la detección de distintas biomoléculas (Campbell R. US Patent No. 4,703,017), drogas y antígenos no proteicos (Sung M. US Patent No. 5,238,652) y antígenos tumor asociados (Manita Hideaki et al. EP 0396801, Simple method for immunological assay.)

Es objeto de la presente invención el desarrollo de un método de evaluación visual para la detección de anticuerpos anti TG, que no requiere de ningún equipamiento de laboratorio, que se realiza en un sólo paso, y que permite en un breve tiempo (alrededor de 15 minutos) detectar la presencia de anticuerpos anti transglutaminasa de clase IgG e IgA en muestras de

suero, plasma o sangre total humana y la utilización de dicho ensayo en el diagnóstico de la EC. La única operación que hay que realizar es la toma de la muestra, colocarla en el lugar indicado y esperar por el resultado de la prueba. Por estas características este método resulta mucho más sencillo y rápido que los desarrollados hasta ahora para el diagnóstico de la EC sobre la base de la detección de anticuerpos anti transglutaminasa. Puede realizarse en laboratorios sin grandes recursos técnicos, en pequeños consultorios médicos, tanto en áreas urbanas como rurales e incluso podría ser realizado por el propio paciente en su casa (auto-test).

Descripción detallada de la invención

De acuerdo a la presente invención se provee un ensayo inmunocromatográfico de tercera generación que permite en un sólo paso la detección de anticuerpos anti transglutaminasa, tanto de clase IgA como IgG en muestras líquidas tales como, suero, plasma o sangre total humana que pueda utilizarse en el diagnóstico serológico de la enfermedad celiaca.

El sistema consta de varios componentes básicos (Figura 1):

1. El antígeno: Transglutaminasa tisular de fuente natural u obtenida por vía recombinante que se conjuga con una sustancia coloreada como el oro coloidal o partículas de latex coloreado que sirve como trazador.
2. Un soporte poroso donde se deposita este conjugado que permite su liberación al ponerse en contacto con un líquido.
3. Una membrana de nitrocelulosa o nylon con un poro de un tamaño entre 5 y 10 micras que permite un flujo lateral de las sustancias reaccionantes a través de la misma.
4. El propio antígeno transglutaminasa que se deposita sobre la membrana de nitrocelulosa o nylon, en una zona denominada zona reactiva, donde queda firmemente unido por fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas.
5. Un reactivo capaz de reconocer a la transglutaminasa conjugada con el oro coloidal (por ejemplo anticuerpos anti transglutaminasa, o una sustancia que se une al oro coloidal) que se coloca en otra zona de la membrana y que sirve para el control del funcionamiento del ensayo.
6. Un material absorbente que se coloca al final de la membrana y en contacto con ella y que permite la evacuación del exceso de líquido que migra a través de la membrana, actuando como una especie de sumidero.

El principio de la prueba radica en la bivalencia que caracteriza a las moléculas de anticuerpo, debido a lo cual cada molécula de anticuerpo es capaz de unirse por dos sitios diferentes a su antígeno específico. Basado en esta propiedad es posible que una misma

molécula de anticuerpo anti transglutaminasa se une por uno de los sitios a su antígeno específico que se encuentre en solución, como resulta en este caso la transglutaminasa conjugada con el marcador coloreado y por el otro sitio al propio antígeno que se encuentre unido a un soporte sólido, en este caso el antígeno unido a la membrana de nylon o nitrocelulosa, lo que se evidencia con la aparición de una marca coloreada en la zona reactiva (Figura 2).

En la práctica un volumen entre 100 y 300 microlitros de una muestra líquida es aplicado en la zona donde se encuentra la sonda del antígeno conjugado que sirve de trazador, lo que provoca su disolución y migración hacia la membrana con la que se encuentra en contacto. Si la muestra contiene anticuerpos anti transglutaminasa específicos, durante la migración se forma un inmunocomplejo estable por la unión del antígeno marcado y los anticuerpos específicos. Este inmunocomplejo se despalza hasta que alcanza la zona reactiva donde es atrapado por el propio antígeno (transglutaminasa) que se encuentra fijado a la membrana en este sitio y reacciona con él. Esta reacción da lugar a la aparición de una señal coloreada en el sitio de reacción, debido a la coloración del marcador que forma parte del complejo. Si no hay anticuerpos anti transglutaminasa presentes en la muestra analizada, no se produce la formación del inmunocomplejo y por lo tanto no aparece señal coloreada en el sitio de reacción (Figura 2).

Para el control del funcionamiento de la prueba en otra zona de la tira de nitrocelulosa, más adelante de la zona reactiva, se deposita un reactivo que reaccionará con el antígeno marcado en exceso (Figura 2). Esta migración se produce porque el volumen de muestra líquida que se aplica es suficiente para arrastrar a las sustancias reaccionantes hasta esta zona e incluso superarla. De esta manera, tanto en el caso de una muestra positiva como negativa, debe obtenerse una señal a este nivel (Figura 2) lo que es una medida del buen funcionamiento de la prueba.

Finalmente para eliminar el exceso de sustancias reaccionantes y facilitar mejores condiciones de flujo, al final de la membrana y en contacto con esta se coloca un material absorbente que actúa como sumidero (Figura 1).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Realización del test.

El antígeno transglutaminasa, obtenido de fuente natural o por vía recombinante, se conjuga con partículas de oro coloidal de diámetro entre 20 y 40 micras siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Oliver C. 1994. Conjugation of colloidal gold to proteins, Chapter 38 In: Javois LC, Human Press Inc., ed Method Mol Biol, 34:303-307).

Al añadir la muestra de suero o plasma o sangre sobre la zona indicada, los anticuerpos anti TG, de estar presentes en la muestra, se unen al antígeno conjugado y lo arrastran formando un inmunocomplejo (IC) que migra hacia una tira de nitrocelulosa (NC) de 4 mm de ancho y una porosidad entre 5 y 10 micras. En unos minutos el IC es atrapado al entrar en contacto con la zona reactiva de la tira donde se encuentra el mismo antígeno unido a la NC. Esta reacción se traduce en la aparición de una señal coloreada en el sitio de reacción. En el caso de una muestra negativa, o sea cuando no hay presencia de anticuerpos específicos contra TG, no se produce la formación del IC y por lo tanto no aparece la señal en la zona reactiva de la tira de NC.

Ejemplo 2. Control del funcionamiento de la prueba.

Para el control del funcionamiento de la prueba en otra zona de la tira de nitrocelulosa, más distante que la zona reactiva con relación al sitio de aplicación de la muestra, se coloca un anticuerpo monoclonal anti TG. Cuando el antígeno conjugado con oro coloidal en exceso atraviesa esta zona es atrapado por este anticuerpo y da la señal de color característica.

De esta forma y luego de 15 minutos de aplicada la muestra los resultados de la prueba pueden interpretarse por simple inspección visual de la siguiente manera (Figura 3):

- Aparición de dos señales coloreadas: indica una muestra positiva.
- Aparición de una señal coloreada: indica una muestra negativa
- Ninguna señal coloreada: Resultado no válido. Debe repetirse la prueba.

Ventajas del método.

1. Se realiza en un sólo paso.
2. No se requiere de ningún tipo de instrumental para realizar la prueba.
3. Fácil de interpretar los resultados.
4. Resultados en menos de 15 minutos.
5. Se detectan anticuerpos de clase IgG e IgA.
6. Es efectivo en pacientes con déficit de IgA.
7. Puede realizarse en suero, plasma o sangre total.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema general del ensayo. En un soporte de un material microporoso se coloca el antígeno (transglutaminasa) conjugado al marcador coloreado. La zona reactiva indica el sitio donde se encuentra el propio antígeno unido a la membrana de nitrocelulosa o nylon. La línea de control indica

el sitio donde se encuentra fijado el anticuerpo monoclonal anti transglutaminasa que sirve para el control del funcionamiento del ensayo. En el extremo derecho se muestra la posición del material absorbente que sirve para evacuar el exceso de sustancias que no reaccionaron. La flecha indica la dirección del flujo lateral que se produce al añadir una muestra líquida en el sitio de aplicación de la muestra.

Figura 2. Principio del funcionamiento del ensayo. Al ponerse en contacto una muestra líquida con el antígeno conjugado al marcador coloreado lo disuelve y arrastra hacia la membrana de nitrocelulosa o nylon. Los anticuerpos anti transglutaminasa presentes en la muestra reaccionan con el antígeno marcado y forman un inmunocomplejo que migra a través de los poros de la membrana hasta que es atrapado por el propio antígeno colocado en la zona reactiva de la misma. El exceso de antígeno marcado continua su movimiento hasta la zona donde se encuentra el anticuerpo monoclonal anti transglutaminasa y es atrapado por este. Como resultado para una muestra positiva se obtiene un marca coloreada en la zona reactiva de la membrana y otra en la zona de control. En el caso de una muestra negativa a la presencia de anticuerpos anti transglutaminasa no se formará el inmunocomplejo y por lo tanto sólo aparecerá la marca correspondiente a la línea de control.

Figura 3. Interpretación de los resultados. Luego de 15 minutos de añadida la muestra: Una sola marca coloreada indicará un resultado negativo a la prueba, dos marcas un resultado positivo y ninguna señal un resultado no válido por lo que debe repetirse el ensayo con otra tira.

Lic. Mariela Vázquez Castillo
Representante Legal, CIGB

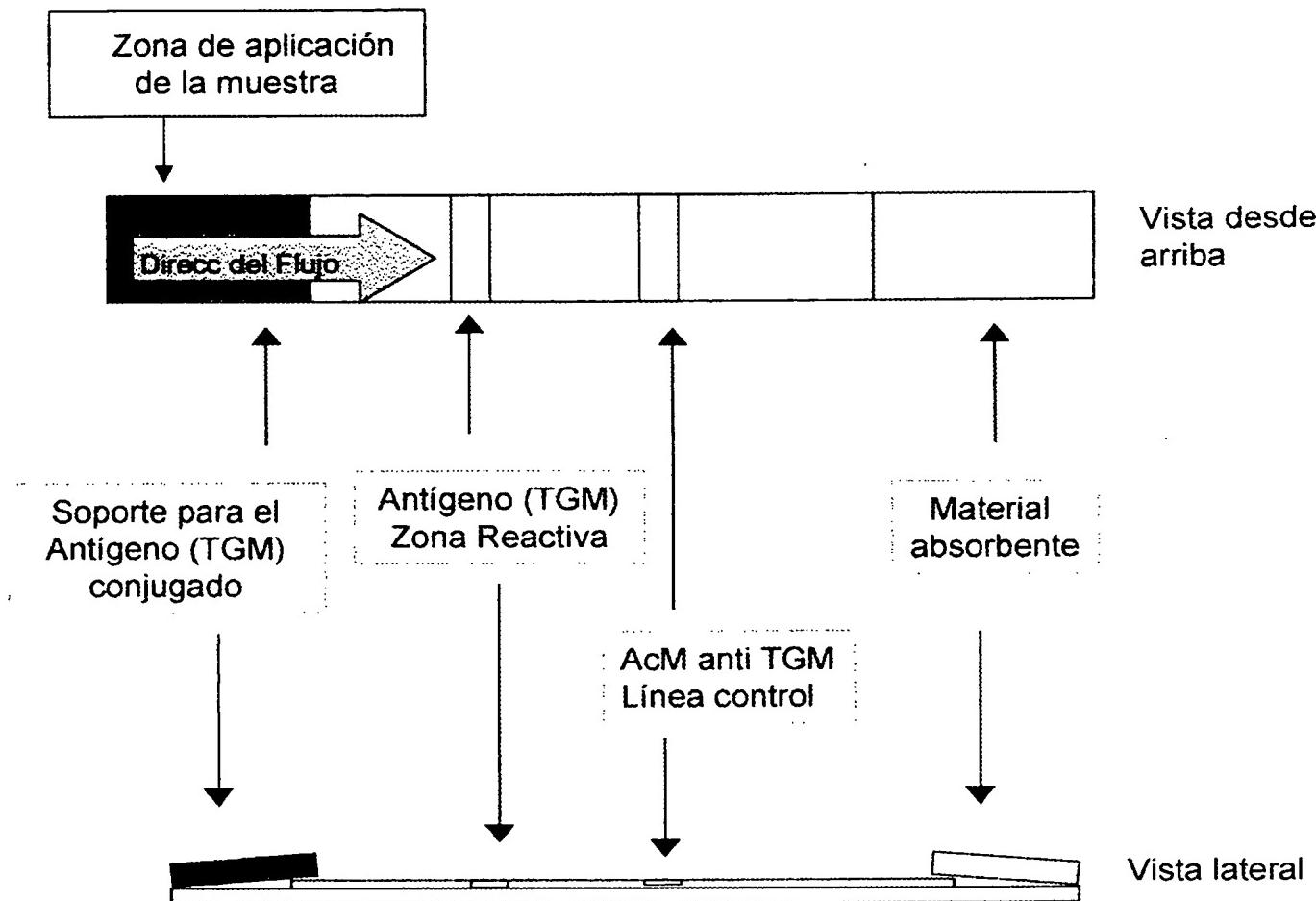
REIVINDICACIONES

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI TRANSGLUTAMINASA CON UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.

1. Procedimiento para la detección de anticuerpos anti transglutaminasa de clase IgA e IgG en muestras líquidas que consiste:
 - a) en la formación de un inmunocomplejo entre los anticuerpos presentes en la muestra con el antígeno transglutaminasa tisular, obtenido de fuente natural o por vía recombinante mediante procedimientos de ingeniería genética, conjugado con una sustancia de detección coloreada y colocado sobre un material poroso que posibilita su liberación al entrar en contacto con un líquido.
 - b) en la reacción del inmunocomplejo descrito en a) con el propio antígeno transglutaminasa, fijado en la zona reactiva de la membrana lo que provoca su depósito en el sitio de reacción.
2. Procedimiento para la detección de anticuerpos anti transglutaminasa de clase IgG e IgA según la reivindicación 1 donde el antígeno transglutaminasa tisular se encuentra fijado a una membrana de nitrocelulosa o nylon, con poro de tamaño entre 5 y 10 micras que permite un flujo lateral de las sustancias reaccionantes.
3. Procedimiento para la detección de anticuerpos anti transglutaminasa de clase IgG e IgA según la reivindicación 1 donde el marcador que se utiliza como sustancia de detección en la sonda del propio antígeno es el oro coloidal o partículas de latex coloreado.
4. Procedimiento para la detección de anticuerpos anti transglutaminasa de clase IgG e IgA según la reivindicación 1 caracterizado porque la reacción del exceso del antígeno conjugado al marcador coloreado con un anticuerpo o un reactivo colocado en otra zona de la membrana se utiliza para el control del funcionamiento del ensayo.
5. Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado por ser capaz de detectar en un sólo paso la presencia de anticuerpos anti transglutaminasa de clase IgG e IgA en muestras de suero, plasma o sangre total humana.

Lic. Mariela Vázquez Castillo
Representante Legal, CTGB

Figura 1

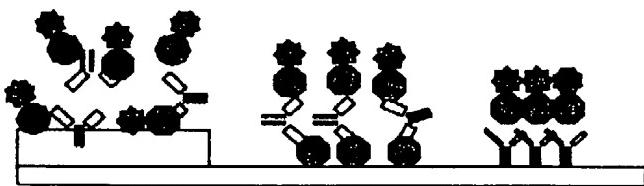
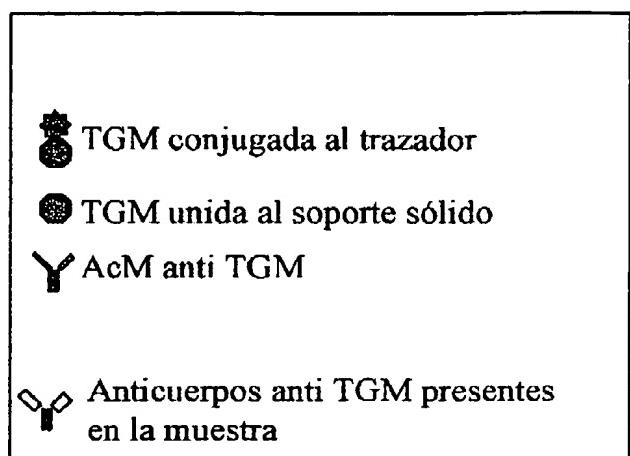
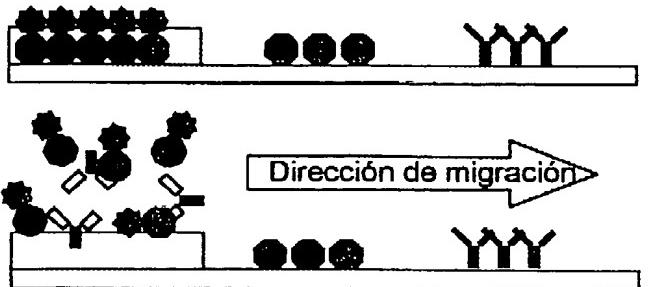


TGM: Transglutaminasa

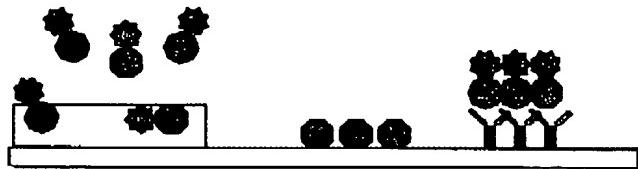
AcM: Anticuerpo monoclonal



Figura 2



Muestra positiva



Muestra negativa

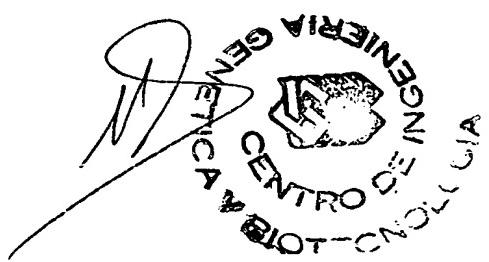
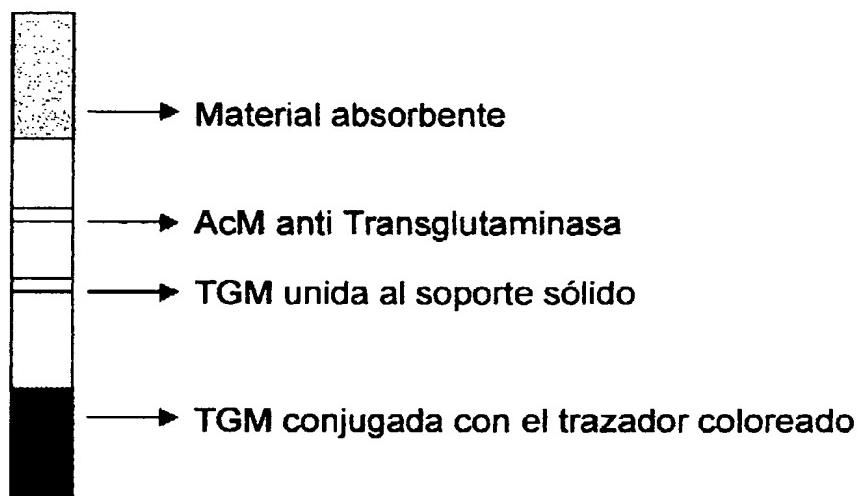
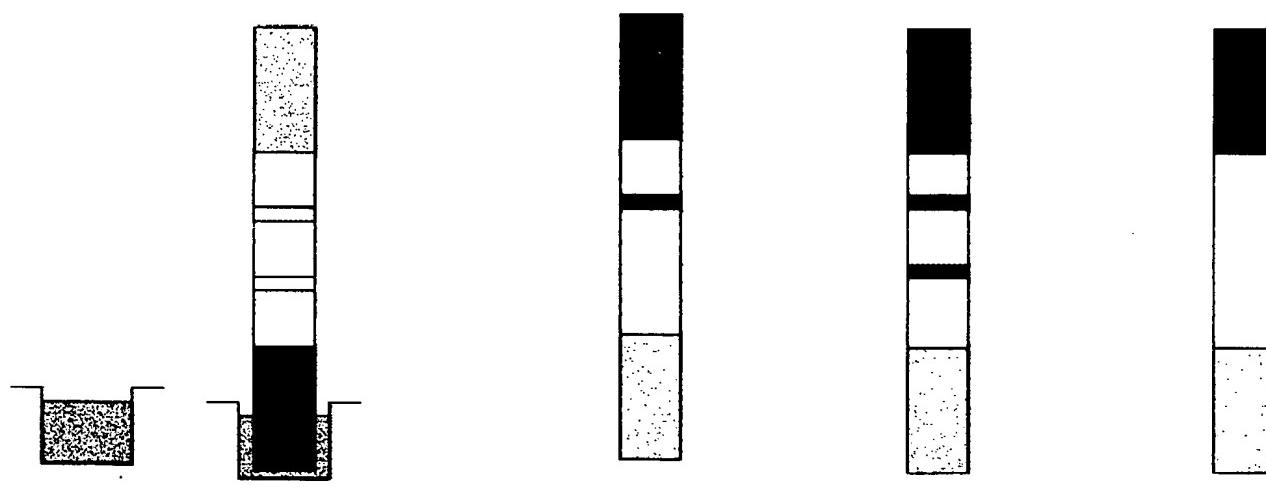


Figura 3



15 MINUTOS DESPUES



Muestra

RESULTADO PARA
MUESTRA NEGATIVA

RESULTADO PARA
MUESTRA POSITIVA

PRUEBA NO
VALIDA.
REPETIR

